

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



FACOLTA' DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di laurea

**ANALOGHI DELLA CURCUMINA A POTENZIALE
ATTIVITA' MODULATORIA DELLA GLICOPROTEINA-P
(P-gp)**

Relatori

Chiar.mo Prof. Aldo Balsamo

Dott.ssa Simona Rapposelli

Candidata

Jessica Tonarelli

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Alla mia famiglia

INTRODUZIONE

GENERALE

CURCUMINA

La **curcumina**, o curcuma, è il principale componente biologicamente attivo di una pianta erbacea perenne: la *Curcuma Longa* (e altre varietà quali *C. Aromatica* e *C. Zedoaria*). Quest'ultima appartiene alla famiglia delle Zingiberaceae, la stessa dello zenzero e del ginger, ed è originaria dell'Asia meridionale, ma trova il suo habitat naturale anche in India, America centrale, nelle Antille e in Malaysia.

Il suo nome deriva dal persiano-indiano Kour-Koum, che significa Zafferano, e infatti, la curcuma è anche conosciuta col nome di "Zafferano delle Indie". Già nel 600 a.C. la curcuma fu menzionata in un trattato di Medicina Assira, e nel primo secolo d.C. il medico Dioscoride la classificò fra le piante dotate di virtù terapeutiche.

E' molto conosciuta come spezia ed è utilizzata da secoli nella Medicina Ayurvedica, per il suo caratteristico e gradevole aroma; infatti, entra anche nella composizione del Curry, insieme a Coriandolo, Cannella, Noce moscata, Chiodi di garofano, Peperoncino e Zenzero.

I fiori, bianchi o color giallo vivace, della *Curcuma*, sono riuniti in una bella spiga fornita di brattee verdi o rosa intenso che li avvolgono, mentre le foglie, con nervature ben evidenti e un lungo picciolo, possono arrivare anche a un metro di lunghezza, e forse da questo deriva il nome di *Curcuma Longa*.



Figura 1: I fiori della *Curcuma Longa*

Questa pianta tropicale è caratterizzata inoltre da un rizoma (fusto sotterraneo allungato e ingrossato, ricco di sostanze amidacee di riserva) di colore giallo intenso caratteristico, che rappresenta la parte officinale contenente i principi attivi.



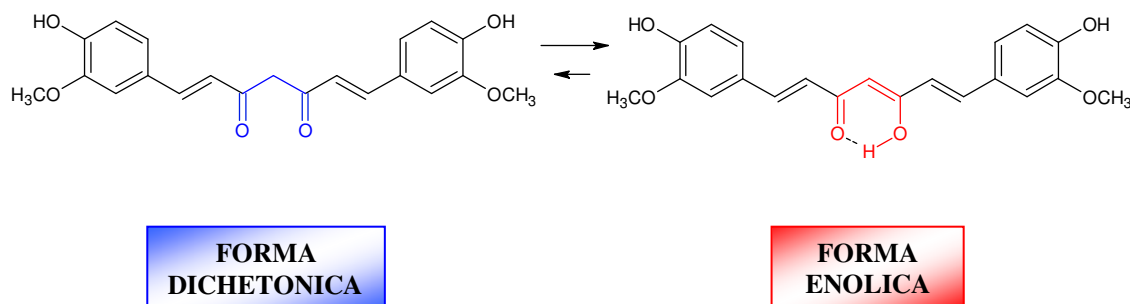
Figura 2: Il rizoma essiccato dal quale si estrae la curcumina.

Il principio è rappresentato proprio dal rizoma che, una volta ripulito, è fatto bollire e quindi essiccato al sole e distillato per estrarne gli oli essenziali.

Fra le numerose sostanze che la Curcuma contiene, le più importanti sono i curcuminoidi: il più significativo è la curcumina, un composto polifenolico che dà la caratteristica colorazione gialla ai rizomi, che oggi sono utilizzati anche come coloranti alimentari con la sigla E100; inoltre sono presenti, anche se in quantità minore, la demetossicurcumina (o curcumina II), la bis-demetossicurcumina (o curcumina III). (Fig. 3)

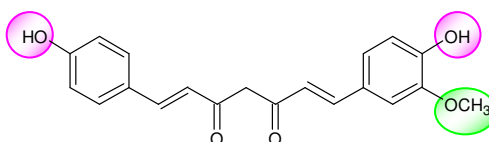
La formula chimica della curcumina è $C_{21}H_{20}O_6$ ed è conosciuta anche con il nome di diferuloilmetano. E' un solido cristallino di colore giallo-arancio, con peso molecolare di 368.39 e temperatura di fusione di $443^{\circ} K$, pari a $170^{\circ}C$; risulta insolubile in acqua ed in etere ma solubile in DMSO, etanolo, metanolo e acetone.

CURCUMINA



(1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione

DEMETOSSICURCUMINA (o curcumin II)



BIS-DEMETOSSICURCUMINA (o curcumin III)

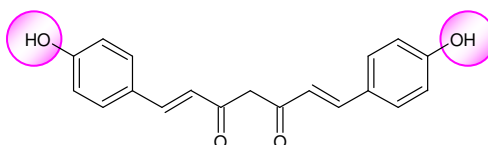


Figura 3: Strutture chimiche dei più importanti curcuminoidi estratti dal rizoma della Curcuma Longa.

CLASSIFICAZIONE BOTANICA



- Regno:** *Plantae* (Piante)
Sottoregno: *Tracheobiota* (Piante vascolari)
Divisione: *Spermatophyta* (Piante con semi)
Sottodivisione: *Angiospermae* (Seme avvolto da frutto)
Classe: *Liliopsida* (Monocotiledoni)
Sottoclasse: *Zingiberidae*
Ordine: *Zingiberales*
Famiglia: *Zingiberaceae* (famiglia del Ginger)
Genere: *Curcuma*
Specie: *Curcuma longa* (Turmerico)

ASPETTI FARMACOLOGICI DELLA CURCUMINA

Gli effetti terapeutici tradizionali

La curcumina è usata nella medicina tradizionale indiana e in quella cinese come disintossicante dell'organismo, in particolare del fegato; come coleretico e colagogo per i disturbi digestivi [1], nell'insufficienza epatica lieve con rallentato flusso biliare; come antinfiammatorio, immunostimolante e antiossidante. [2]

Queste proprietà salutari attribuite alla curcuma dalla tradizione e dagli usi popolari, sono le stesse che oggi le sono riconosciute dalla medicina ufficiale alla luce delle numerosissime ricerche scientifiche; sono confermate le attività farmacologiche tradizionali, associate a una bassissima tossicità, ma sono state evidenziate anche altre importanti proprietà, come quella antitumorale. [3]

Studi hanno dimostrato come nei paesi asiatici, in particolare l'India, in cui la curcuma è utilizzata abitualmente come alimento, la popolazione presenta una bassissima incidenza di tumori.

Pare comunque, che sia "*in vitro*" che "*in vivo*", la curcumina abbia la capacità di inibire l'angiogenesi del tumore, cioè la formazione di nuovi vasi sanguigni che servono per alimentarlo: in questo modo il tumore non può crescere, mancando l'apporto di nutrimento necessario.

Attività antinfiammatoria

La curcumina regola numerosi fattori di trascrizione, citochine, proteine chinasi, molecole di adesione, stati ossido-riduttivi ed enzimi che sono legati all'infiammazione, inducendone la downregulation. Inibisce l'espressione di vari fattori, quali ad esempio l'interleuchina 1 β (IL-1 β), l'interleuchina 6 (IL-6), il fattore di necrosi α (TNF- α) e la ciclina E. E' noto che il processo infiammatorio gioca un ruolo cruciale nella maggior parte delle malattie croniche, incluse quelle neurodegenerative e neoplastiche.

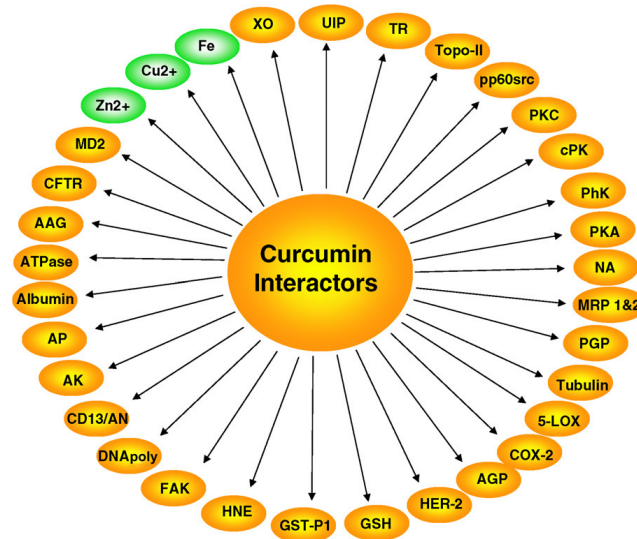


Figura 3: Alcuni dei substrati con i quali la curcumina interagisce.

Il TNF α è il maggiore mediatore dell'infiammazione in molti disturbi e questo è regolato dall'attivazione di alcuni fattori di trascrizione, tra cui i fattori nucleari NF- κ B.

Perciò, agenti che provocano la downregulation del NF- κ B e del suo gene regolatore rappresentano una potenziale utilità per il trattamento di diverse malattie: la curcumina è stata riconosciuta come un potente bloccante dell'attivazione di questo fattore nucleare.

Questo fattore di trascrizione gioca un ruolo cruciale nella via di trasduzione del segnale coinvolta nei disturbi infiammatori sia cronici che acuti, ma anche in vari tipi di cancro. [4] Nello stato inattivo il fattore nucleare NF- κ B è localizzato nel citoplasma: la sua attivazione prevede la traslocazione dal citoplasma al nucleo; affinché quest'ultima avvenga sono necessarie: l'attivazione di varie chinasi e, la fosforilazione e la degradazione dell'I κ B, cioè l'inibitore citoplasmatico dell'NF- κ B. [5] L'azione della curcumina si esplica proprio a questo livello attraverso l'inibizione dei segnali che portano all'attivazione del fattore nucleare quali l'inibizione della fosforilazione e della degradazione dell'I κ B indotte dal TNF.

In un altro studio, la curcumina ha mostrato di inibire l'attivazione dell'NF- κ B indotta dal TNF nelle cellule mieloidi umane ML-1a [6], ma anche quella indotta da altri agenti come, ad esempio, il perossido di idrogeno. E' stato evidenziato che questo

effetto non è dovuto a modificazioni chimiche della struttura proteica del fattore NF-kB.

Il TNF e il perossido di idrogeno comportano la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI); un aumento dei livelli di ROI può scatenare la risposta infiammatoria che si esplica attraverso l'attivazione del fattore stesso. La curcumina sembra esercitare la sua attività antinfiammatoria riducendo i livelli di ROI nel plasma, con conseguente inibizione indiretta dell'attivazione del fattore nucleare NF-kB. [6]

Attività antiossidante

Ha suscitato molto interesse l'attività antiossidante di questa spezia indiana, soprattutto nella terapia preventiva di malattie neurodegenerative.

Studi "*in vitro*" hanno dimostrato che la curcumina inibisce l'attività della lipo-ossigenasi e della ciclo-ossigenasi nei fibroblasti di ratti in evidente stato infiammato [7], della xantina-ossigenasi nelle cellule NIH3T3 [8] e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei macrofagi attivati nei topi. [9]

Un recente studio ha rivelato, inoltre, che la stimolazione ossidativa delle proteine G nella membrana delle cellule cerebrali umane da parte di pro-ossidanti metabolici, quali omocisteina e perossido di idrogeno, può essere notevolmente ridotta in seguito a somministrazione di curcumina. [10]

L'ipotesi dello stress ossidativo nell'invecchiamento precoce e nei disturbi legati all'età suggerisce gli effetti benefici antiossidativi della curcumina nella prevenzione e nella terapia di malattie neurodegenerative.[11] Questi effetti della spezia sono stati studiati principalmente in modelli cellulari e animali.

Uno dei pochi studi effettuati sull'uomo ha mostrato che la curcumina, con un meccanismo dose-dipendente, aumenta l'attività delle proteine G nelle membrane di cellule della corteccia centrale (FC). [12]

Questo effetto stimolatorio è risultato essere più marcato nell'anziano sano che non in quello affetto da Alzheimer. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la progressione dell'AD conduce ad una notevole alterazione dei livelli di proteina G nelle membrane cerebrali umane FC.

La curcumina sembra inoltre avere un'azione agonista o modulatoria nei confronti dei recettori estrogenici nel cervello [10] ed in periferia [13], che sono accoppiati a proteina G. [14]

Vista la sua notevole lipofilia la curcumina è capace di attraversare la barriera emato-encefalica e questo suggerisce che gli effetti neuroprotettivi potrebbero implicare la stimolazione del recettore estrogenico mediato dalla proteina G.

Precedenti ricerche avevano dimostrato che una modificazione ossidativa rilevante a carico delle proteine G in modelli di neurodegenerazione può iniziare o promuovere i segnali di morte neuronale. [15]

Così è stato evidenziato che la stimolazione ossidativa della proteina G da parte di agenti pro-ossidanti, ossitocina e perossido di idrogeno, altamente espressi durante l'invecchiamento precoce e nelle patologie neurodegenerative, potrebbe essere ridotta con la curcumina.

Attività antiaggregante

La curcumina inibisce la produzione di trombossani “*in vitro*” ed “*ex vivo*” ed aumenta la fibrinolisi. Impedisce inoltre l'aggregazione piastrinica indotta dall'ADP, dalla noradrenalina o dal collagene (efficacia pari all'aspirina) senza diminuire la sintesi di prostacicline nell'epitelio aortico (al contrario dell'aspirina). [2]

Attività ipoglicemizzante

Le varie citochine infiammatorie e alcuni fattori di trascrizione come NF-kB e NRF2, oltre che nelle patologie infiammatorie, sono implicati anche in vari disordini metabolici tra cui il diabete. In questa patologia, infatti, sia l'attivazione del TNF α che del NF-kB sono correlate ad un'aumentata resistenza all'insulina. [16]

Nel diabete la curcumina può agire diminuendo i livelli di glucosio nel sangue e aumentando lo stato antiossidante delle cellule β pancreatiche. [2]

Alcuni studi hanno, infatti, valutato la correlazione esistente tra la stimolazione indotta dalla curcumina sulle cellule β del pancreas e l'attività ipoglicemica di questo

composto, mostrando che la curcumina è capace di stimolare l'attività elettrica nelle cellule β pancreatiche del ratto, tramite l'attivazione del canale f anionico volume-regolato. Questa attivazione provoca una depolarizzazione delle cellule β pancreatiche e conseguente rilascio di insulina.

Altro meccanismo ipotizzato per spiegare l'azione ipoglicemica della curcumina si basa sull'alterazione del flusso di ioni cloro e quindi di H_2O a livello delle cellule β pancreatiche.

La curcumina ha anche un'azione sui livelli di colesterolo che spesso sono alterati in patologie metaboliche come il diabete. Nei ratti diabetici trattati con la curcumina è stato osservato un incremento significativo dei livelli di trigliceridi e fosfolipidi nel sangue legato all'aumento dell'attività della colesterolo-epatico- 7α -idrossilasi responsabile del catabolismo del colesterolo.

Altri studi hanno evidenziato che la curcumina riduce drasticamente l'infiltrazione dei macrofagi del tessuto adiposo bianco, aumenta la produzione di adiponectina e diminuisce l'attività epatica nucleare dell' $NF-\kappa B$ e dei marcatori dell'infiammazione, riducendo così le alterazioni infiammatorie e metaboliche associate al diabete.

Attività anti-tumorale

Numerose ricerche, effettuate quasi tutte nell'ultimo decennio, si sono incentrate sulla potenziale attività antitumorale della curcumina. Sia "*in vitro*" che "*in vivo*" è stato dimostrato che questo pigmento giallo può inibire la crescita di molte cellule cancerose nei diversi organi tra i quali, il sangue, il cervello, il sistema gastrointestinale, il pancreas e la prostata. [17]

I curcuminoidi hanno mostrato di esercitare la loro azione attraverso molteplici meccanismi e quindi di essere un rimedio multitasking che agisce ai vari livelli di inizializzazione, promozione, progressione e disseminazione tumorale.

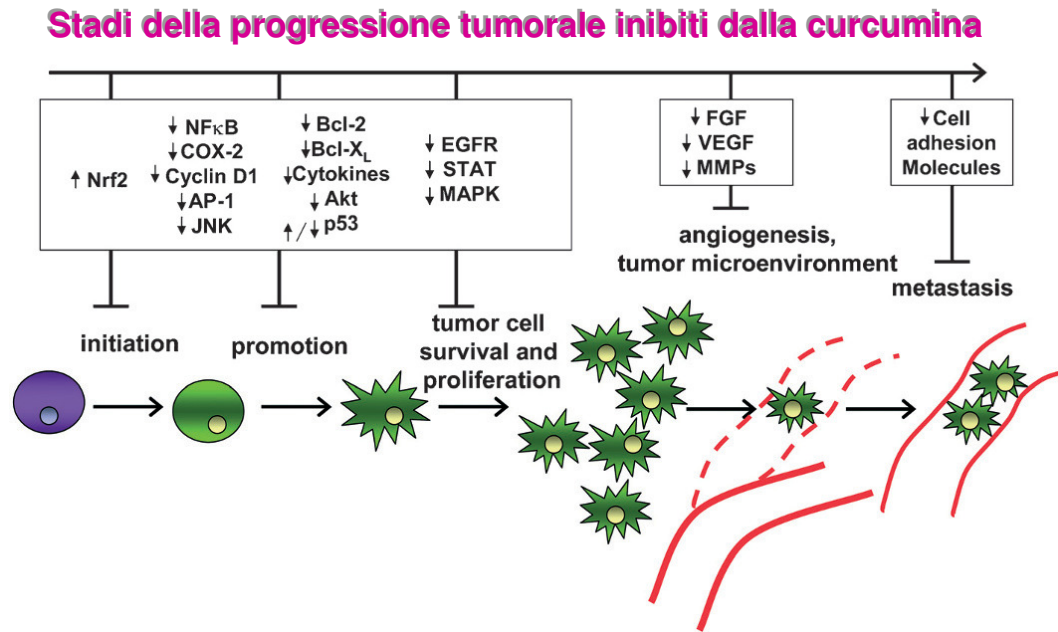


Figura 4: Stadi della progressione tumorale inibiti dalla curcumina.

La curcumina è una sostanza potenzialmente anti-proliferativa, anti-invasiva e anti-angiogenetica; è un mediatore della chemioresistenza e della radioresistenza ed un agente chemiopreventivo. Ha mostrato, infatti, una notevole efficacia come agente citotossico in linee cellulari cancerose di ratto MBT-2 e di essere umano UMUC. [18]

Altre ricerche hanno evidenziato che la curcumina potenzia gli effetti citotossici dei comuni agenti chemioterapici in varie linee cellulari attraverso l'inattivazione del fattore nucleare NF-kB. [19]

Un pre-trattamento con la spezia in linee cellulari di epatocarcinoma, ha causato un'inibizione tempo-dipendente dell'attività del fattore nucleare NF-kB, indotta dalla doxorubicina. [20]

In altri studi condotti "*in vitro*", la presenza della curcumina ha promosso gli effetti citotossici di farmaci utilizzati nella chemioterapia come il tamoxifene [21], il cisplatino, la camptotecina e la vincristina. La linea cellulare del mieloma multiplo umano (MM) è la meno sensibile alla vincristina ma il trattamento concomitante con la curcumina ne aumenta la citotossicità dal 10% al 70%. [22]

La contemporanea somministrazione di curcumina ha notevolmente diminuito la concentrazione di paclitaxel richiesta per indurre una risposta antitumorale in linee

cellulari umane di cancro cervicale. [23] Questo effetto è spiegabile attraverso la capacità della curcumina di aumentare la permeabilità della membrana, l'attivazione di caspasi ed il rilascio di citocromo C che sono dovuti all'agente chemioterapico.

Un altro aspetto interessante dell'attività della curcumina è la sua capacità di esercitare sia effetti radioprotettivi che radiosensibilizzanti nelle cellule cancerose.

Sebbene i meccanismi attraverso i quali la spezia esplica questi effetti contrapposti non siano ancora molto chiari, tutto ciò suggerisce che la capacità di questo principio attivo naturale di ridurre lo stress ossidativo e di inibire la trascrizione di geni a questo correlati, potrebbe fornire la protezione contro gli effetti dannosi della radiazione, mentre l'attività radiosensibilizzante potrebbe essere dovuta ad una upregulation dei geni responsabili della morte cellulare. [24]

La curcumina somministrata in concomitanza con la radioterapia ha mostrato una notevole promozione dell'inibizione clonogenica indotta dalla radiazione e dell'apoptosi in linee cellulari di cancro prostatico PC-3. [25]

Le radiazioni inducono l'espressione di molti fattori tra i quali il fattore NF- κ B: questo è implicato nella regolazione della funzionalità delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2. Una sovraespressione del fattore nucleare NF- κ B dovuta alle radiazioni porta ad una upregulation di queste proteine. [25]

Recentemente, alcuni studi hanno evidenziato che la curcumina inibisce anche l'espressione della proteina ciclo-ossigenasi 2 (COX2) in diverse linee di cellule tumorali. Anche questo effetto, molto probabilmente, è riconducibile alla downregulation del fattore NF- κ B, il quale è necessario per la sua attivazione. [25]

La COX2 è associata a molte varietà di cancro e vista la notevole importanza della sua inibizione nella cancerogenesi umana, molte ricerche si sono focalizzate sullo sviluppo di sostanze che dimostrassero un'attività inibitoria su questa proteina: tra queste anche la curcumina.

La curcumina, attraverso l'inibizione del fattore nucleare, opera anche attraverso la regolazione delle attività di modelli molecolari addizionali che controllano l'adesione cellulare, l'apoptosi e l'invasione. A questo riguardo questa sostanza ha dimostrato di essere un potente inibitore dell'espressione del fattore di necrosi tissutale α (TNF- α) e del fattore di crescita endoteliale VEGF, il quale è il principale fattore di migrazione, gemmazione, sopravvivenza e proliferazione durante l'angiogenesi.[26]

Gli ultimi impieghi clinici

AIDS

Ci sono molte ricerche che indicano che la curcumina potrebbe essere un trattamento efficace per la Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS). [30] Questo suo effetto è mediato attraverso la soppressione della replicazione dell' "Human Immunodeficiency Virus" (HIV), dovuta al fatto che inibisce l'HIV proteasi, l'HIV1 integrasi e altri recettori coinvolti in questo processo.

Così la curcuma ha un grande potenziale nel trattamento dell'AIDS.

SCLERODERMIA

Poiché la Sclerodermia è una malattia che prevede l'eccessiva deposizione di collagene e l'iperproliferazione di fibroblasti, la curcumina può fornire un beneficio terapeutico attraverso la sua capacità di sopprimere la proliferazione dei fibroblasti polmonari in un processo che coinvolge l'inibizione della proteina chinasi Cε (PKCε). E' stato scoperto che questo pigmento giallo induce l'apoptosi nei fibroblasti polmonari sclerodermosi (SLFs) ma non in quelli normali (NLFs) e l'effetto è relativo all'espressione di PKCε. La presenza di questa proteina e degli enzimi di detossificazione di Fase II inibisce l'apoptosi indotta dalla curcumina nei fibroblasti normali (NLFs) ma non in quelli sclerodermosi (SLFs). [27]

Quindi la curcumina può avere un valore terapeutico nel trattamento della Sclerodermia.

CENNI DI FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA

Distribuzione e metabolismo

Il profilo farmacologico della curcumina è oggetto di studio già dal 1978. Vari laboratori di ricerca, infatti, si sono occupati dell'assorbimento, della distribuzione e dell'escrezione di questa spezia.

Dati sperimentali evidenziano che dopo somministrazione orale, circa il 75% della dose ingerita viene escreta attraverso le feci e le urine. Come è indicato dai livelli plasmatici e dall'escrezione biliare, la curcumina presenta un basso assorbimento intestinale. [28]

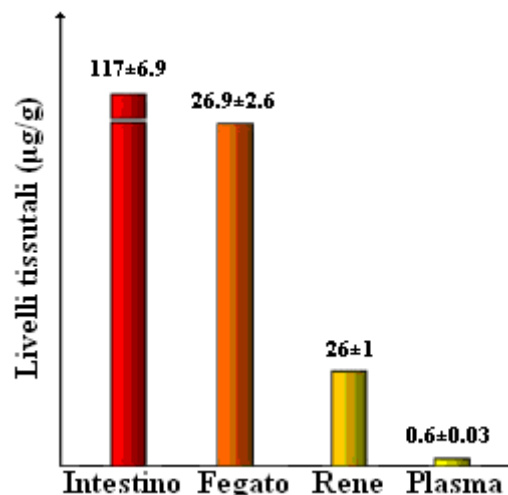


Diagramma 1: Distribuzione tissutale della curcumina somministrata per via endovenosa.

Il picco della concentrazione plasmatica viene raggiunto dopo 1-2 ore dalla somministrazione orale, con un declino graduale nell'arco delle 12 ore successive.

Se la somministrazione, invece, avviene per via endovenosa, la curcumina viene attivamente trasportata nella bile.

I metaboliti biliari primari sono i glucuronidi della tetraidrocurcumina (THC) e della esaidrocurcumina (HHC), mentre il metabolita secondario è l'acido diidroferulico accompagnato da alcune tracce di acido ferulico.

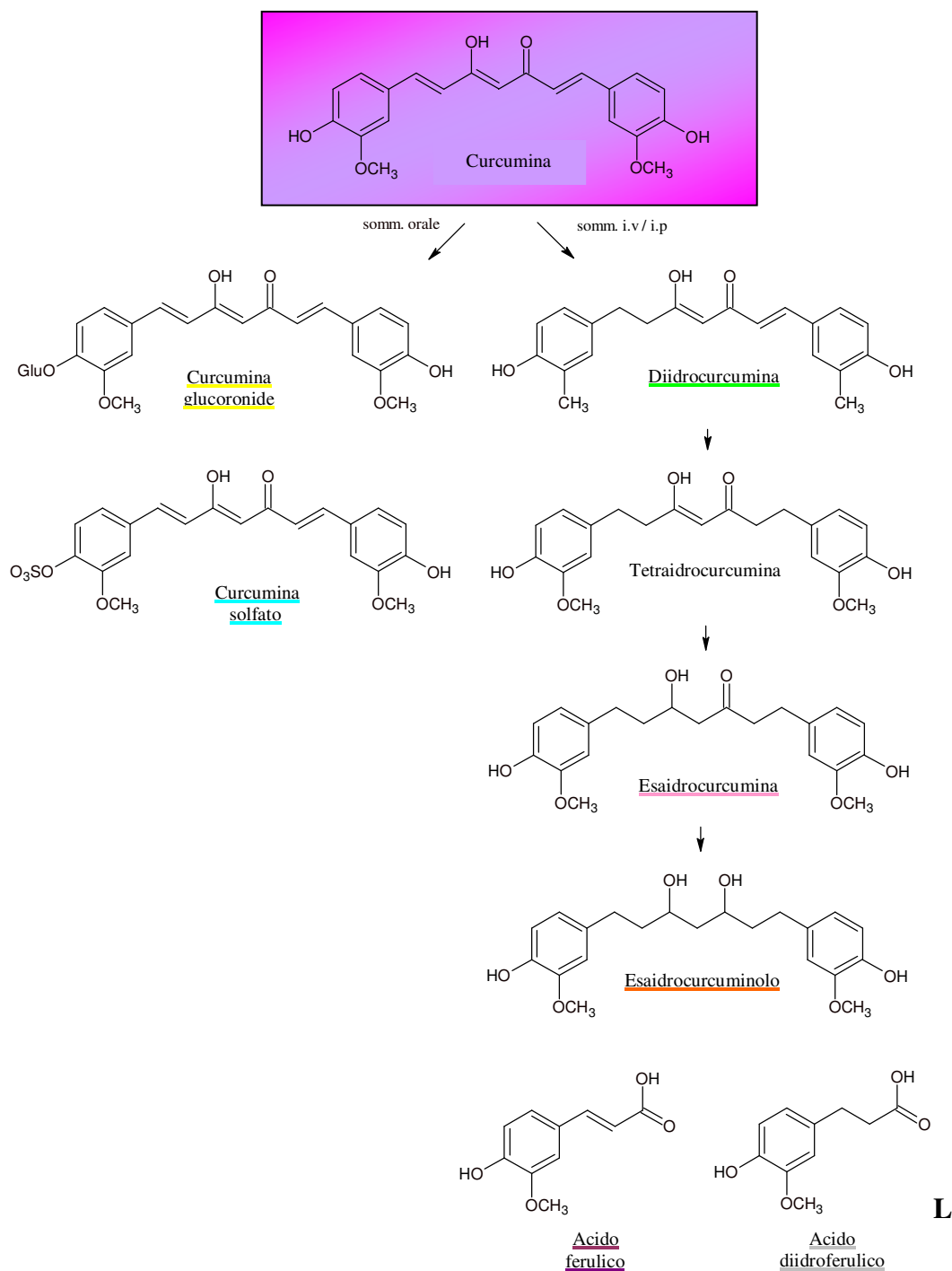


Figura 5: Struttura della curcumina e dei suoi metaboliti.

La Biodisponibilità

Questo è uno degli aspetti cruciali di questa spezia dalle tante qualità e rappresenta il motivo per cui ne viene limitato l'utilizzo.

E' stato di gran lunga documentato che la curcumina esibisce una bassa biodisponibilità; questo effetto è riconducibile al fatto che presenta uno scarso assorbimento, una rapida metabolizzazione ed eliminazione sistemica. [29] Sono stati ampiamente studiati modi per ovviare a questo svantaggio che ne limita l'impiego terapeutico. Ha suscitato molto interesse il ruolo degli adiuvanti, cioè sostanze capaci di bloccare il metabolismo della curcumina. Ad esempio, si è osservato che la concomitante somministrazione di curcumina con Piperina (presente nel pepe nero) ha portato ad un incremento della biodisponibilità del 150% nei ratti e del 2000% negli esseri umani, ciò è dovuto all'inibizione della coniugazione con l'acido glucuronico (svolta appunto dalla Piperina). [30]

Altri modi usati per migliorarne la biodisponibilità sono la produzione di nanoparticelle, liposomi, micelle e complessi fosfolipidici della curcumina; i possibili vantaggi attribuibili a queste formulazioni sono:

- 1) aumentato tempo di circolazione,
- 2) aumentata permeabilità cellulare,
- 3) aumentata resistenza ai processi metabolici.

I potenziali effetti indesiderati e la Tossicità

La Food and Drug Administration (FDA) ha dichiarato la curcumina come “generally regarded as safe” (GRAS), che letteralmente tradotto significa “generalmente giudicata come sicura”.

Sebbene esibisca una notevole varietà di attività farmacologiche ed abbia dimostrato di essere abbastanza sicura negli animali e nell'uomo, sono stati effettuati alcuni studi concernenti la sua tossicità. [31]

Il National Toxicology Program (NTP) ha valutato sia la tossicità a breve termine che quella a lungo termine dell'oleoresina del Turmerico, composto per il 79-85% dalla curcumina.

Sebbene siano stati pubblicati numerosi studi sull'effetto sinergico della curcumina con la chemioterapia, è stato anche dimostrato che la sua somministrazione abolisce l'effetto della ciclofosamide sulla riduzione della massa tumorale nel cancro alla mammella. [32] Il motivo per cui la curcumina esibisce questi effetti contrapposti non è molto chiaro; è noto però, che svolge sia un'attività antiossidante che una pro-ossidante, e che queste attività opposte variano in base alla concentrazione. Si può così presupporre che questo meccanismo dose-dipendente sia implicato anche nella duale attività di chemioresistenza e chemosensibilizzazione. Non sono stati effettuati molti studi a lungo termine nei quali la curcuma abbia dimostrato la sua tossicità e i suoi effetti avversi. Sono necessarie molte ricerche sia nei roditori che nei soggetti umani per determinare la sicurezza della curcumina. L'evidenza epidemiologica disponibile, comunque, mostra che l'incidenza di molti tipi di cancro è più bassa nelle popolazioni che assumono curcuma circa 100-200 mg/dì per lunghi periodi di tempo.

MODULAZIONE DELLA P-gp DA PARTE DELLA CURCUMINA

La glicoproteina P (P-gp) è una glicoproteina di membrana appartenente alla famiglia delle proteine di trasporto ABC- ATP dipendente. [33]

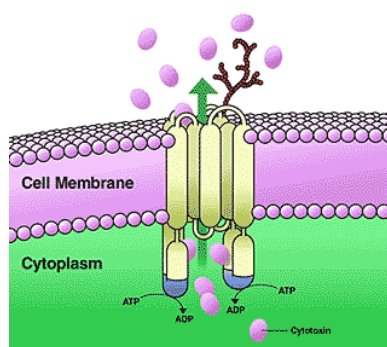


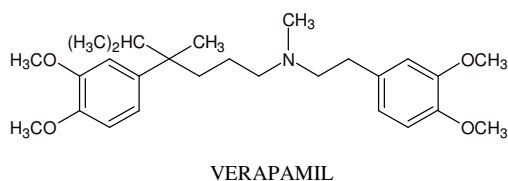
Figura 6: Rappresentazione tridimensionale della glicoproteina-P.

E' noto che questa pompa di efflusso è presente in molte barriere fisiologiche nel corpo, come la barriera emato-encefalica e la barriera placentare.

Questo meccanismo di efflusso gioca un ruolo importante nella multidrug resistance (MDR) nel cancro visto che molti farmaci antitumorali come vinblastina, doxorubicina e paclitaxel sono substrati di questa pompa e altri composti, quali steroidi, antivirali e farmaci cardiaci, vengono trasportati dalla P-gp stessa.[34]

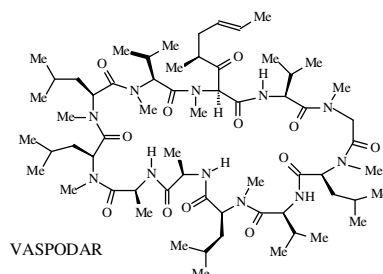
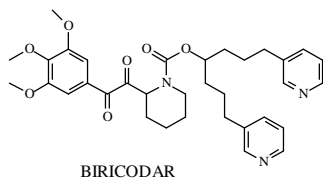
Il motivo dell'importanza clinica del suo meccanismo di estrusione, per la MDR e per il trattamento del cancro, e le proprietà inibitorie di molti composti sull'attività della glicoproteina P sono stati approfonditamente studiati nel corso di questi anni. [35]

L'agente bloccante il canale al calcio, il verapamil, è stato il primo farmaco descritto come P-gp inibitore (I° generazione).



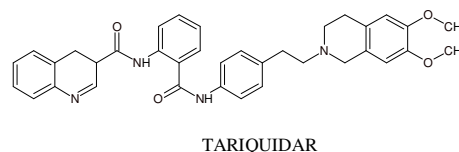
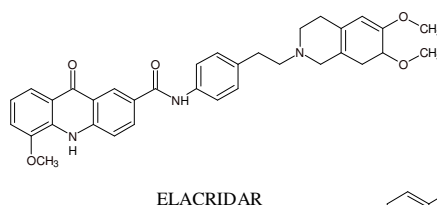
I°
generazione

In seguito, molti altri composti (II° e III° generazione) sono stati studiati per il loro effetto inibitorio come il vaspodar, il biricodar, il tariquidar e l'elacridar.



II°
generazione

III°
generazione



Sebbene questi agenti siano efficaci modulatori della P-gp, presentano uno svantaggio non sottovalutabile: affinché si abbia l'effetto inibitorio richiesto sulla glicoproteina-P, la loro concentrazione plasmatica deve essere molto elevata, comportando così una notevole tossicità.

I composti fitochimici, come la curcumina, hanno il vantaggio di essere presenti nella dieta e di non presentare effetti secondari marcati.

Sono stati valutati gli effetti della curcumina sull'espressione e sulla funzione della P-gp intestinale. [36]

Questo studio è stato condotto sulle cellule Caco-2, cioè delle linee di cellule intestinali che hanno permesso di studiare l'assorbimento dei farmaci ed il relativo meccanismo. E' stata valutata l'attività della curcumina su cellule della linea Caco-2 che iperesprimono la P-gp.

Da questa valutazione è emerso che la curcumina inibisce sia la sua espressione che la sua funzione, tramite la riduzione dell'espressione di MDR1, la quale è regolata sia dal fattore trascrizionale AP-1 che da quello nucleare NF-kB, sui quali la curcumina ha effetto di downregulation.

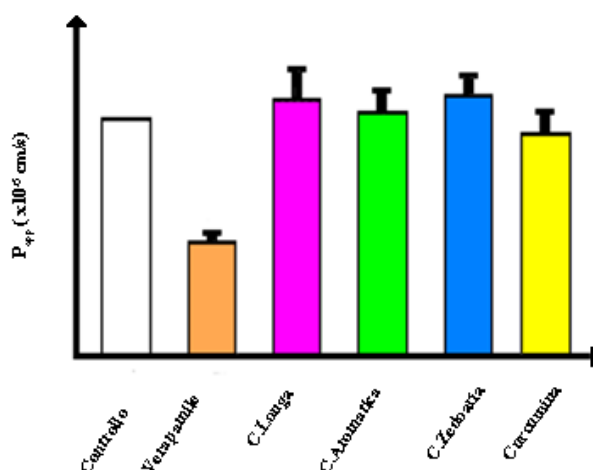


Diagramma 2: Reversibilità dell'espressione e della funzionalità della P-gp sulle cellule Caco-2, indotta dalla somministrazione di principio attivo isolato e miscela di curcuminoidi contenuti nelle varie specie di Curcuma in concentrazioni differenti.

Un ulteriore studio ha esaminato due linee cellulari di carcinoma cervicale: una multidrug-resistance (MDR) KB-V1, la quale iperesprime la glicoproteina-P e una sensibile ai farmaci KB-3-1. E' stata notata una promozione della citotossicità della vinblastina, dovuta alla concomitante somministrazione di curcumina, la quale inibisce l'attività di estrusione della P-gp e l'espressione del gene MDR1. [37]

La curcumina a concentrazioni di 5.0 $\mu\text{mol/l}$, 10.0 $\mu\text{mol/l}$, 20.0 $\mu\text{mol/l}$ ha dimostrato di ridurre il IC_{50} della vincristina nelle cellule cancerose gastriche VCR-resistenti in modo dose-dipendente, suggerendo così la sua capacità di revertire la multidrug-resistance in queste cellule. [38]

RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITA' DEGLI ANALOGHI DELLA CURCUMINA

Numerosi analoghi della curcumina sono stati sintetizzati e testati per studiare la loro interazione con i target biologici conosciuti e per migliorare il profilo farmacologico di questo prodotto naturale.

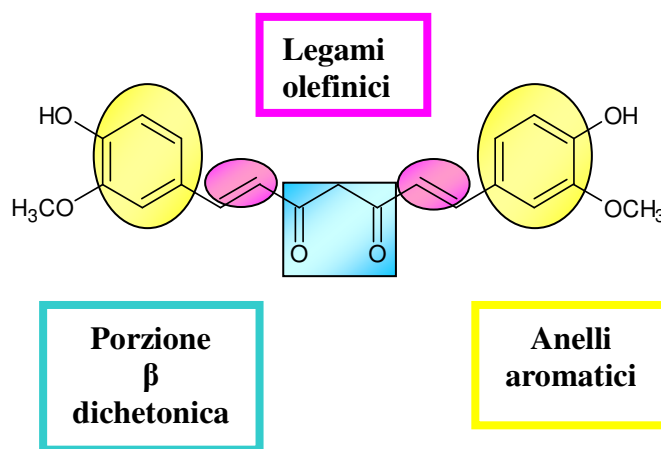


Figura 7: Regioni funzionali della curcumina

Si possono distinguere 3 elementi strutturali tipici: due anelli aromatici legati con un doppio legame ad un β dichetone.

Le modifiche sintetiche più preponderanti hanno riguardato i sostituenti sugli anelli aromatici.

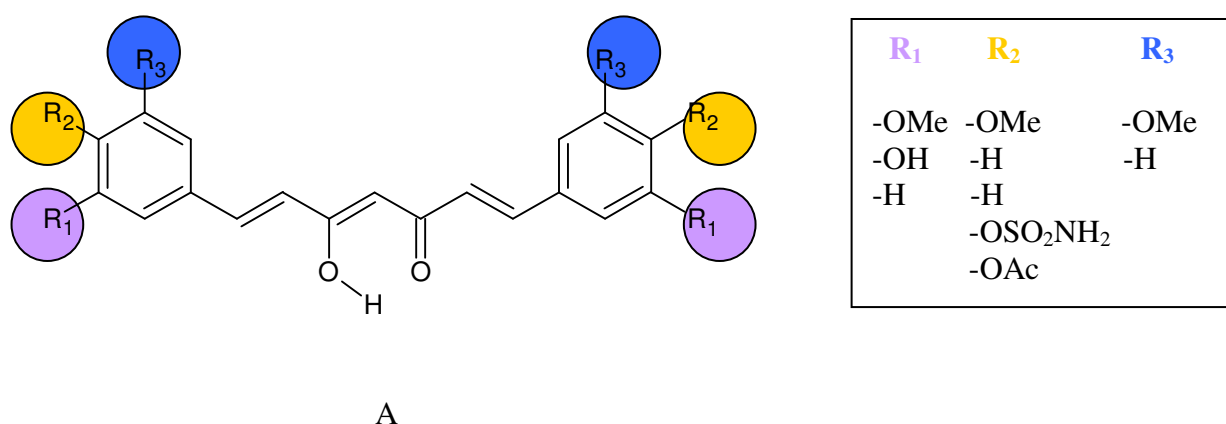
In un primo studio, allo scopo di progettare agenti antitumorali per il trattamento del cancro sia prostatico che mammario, sono state sintetizzate molte serie di analoghi della curcumina e sono state esaminate per valutarne le relazioni attività struttura. [39]

Strutturalmente, questi composti possono essere divisi in due gruppi:

- a) una serie eptadiendionica (composti A) e
- b) una serie pentadiendionica (composti B).

a) serie eptadiendionica (composti A)

Per la prima di queste due serie, le modificazioni sono focalizzate sull'anello aromatico e sulla regione β -dichetonica.



L'eliminazione del gruppo OH in posizione 4 o l'incorporazione di un gruppo OCH₃ in 5 alla curcumina ha portato ad una lieve diminuzione dell'attività antiproliferativa. Invece, l'attività rimane inalterata se i gruppi OCH₃ in 3 della curcumina vengono rimossi.

In aggiunta, è interessante notare che quando i gruppi 3-OCH₃ e 4-OH si invertono l'attività antiproliferativa si riduce.

La curcumina esiste come una miscela di 2 strutture tautomeriche (dichetonica e chetoenolica). La chimica computazionale ha previsto che la forma enolica risulti più stabile rispetto al tautomero dichetonico; ciò è dovuto alla natura acida dei protoni sul carbometilene centrale, alla stabilità dell'enolo attraverso un legame ad idrogeno intramolecolare, e, allo stabilirsi di un sistema completamente coniugato.

Questa precisazione è stata confermata attraverso le strutture cristalline ai raggi X e più recentemente con le analisi NMR della struttura della curcumina in soluzioni tali che il composto esista solo in forma enolica.

Così, i composti che mimano la configurazione enolica della curcumina, hanno mostrato una maggiore stabilità ed un'aumentata attività antiproliferativa.

Nonostante le sue vaste attività biologiche, l'utilizzo potenziale della curcumina è fortemente limitato dalla sua scarsa biodisponibilità. Ciò è dovuto, in parte,

all'instabilità fisica e metabolica della molecola, in quanto la curcumina si decompone rapidamente in condizioni sia neutre che basiche. Inoltre, è stato riportato che questa subisce, sia “*in vitro*” che “*in vivo*”, il metabolismo di Fase I e di Fase II attraverso l'ossidazione, la riduzione, la glucuronizzazione e solfatazione (le ultime due avvengono sui gruppi OH in 4).

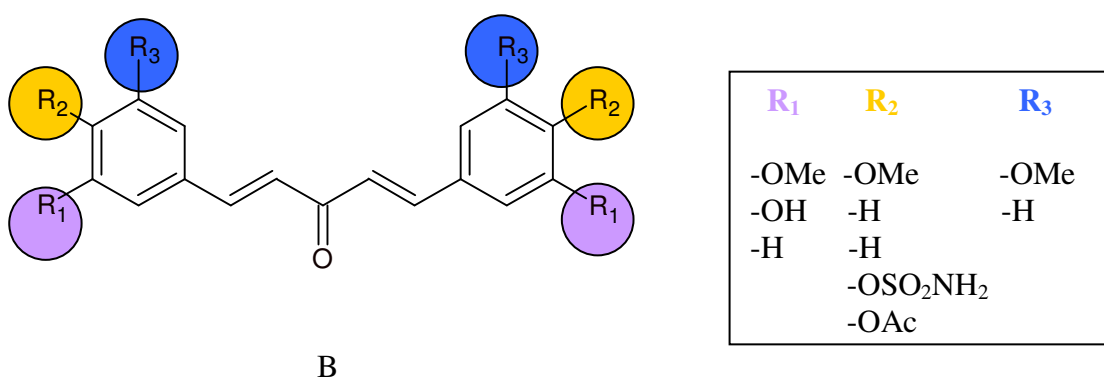
E' documentato che la protezione dei gruppi OH in 4 attraverso la metilazione (a formare il gruppo 4 metossi) ha migliorato la sua stabilità. Così, i composti sono stati sintetizzati con i gruppi 4-OH convertiti in derivati metossilici, acetati e sulfammati.

La base logica dell'uso del sulfammato come gruppo protettivo è nata dal fatto che i derivati dell'acido sulfammico di vari steroidi, incluso l'estradiolo, hanno dimostrato di aumentare l'assorbimento e di conseguenza di aumentare l'attività.

Tutti questi composti hanno un'attività antiproliferativa notevolmente aumentata rispetto a quella della curcumina.

b) serie pentadiendionica (composti B)

La seconda serie di analoghi della curcumina contiene una porzione pentadienonica e questi composti hanno esibito una potente attività antiproliferativa.

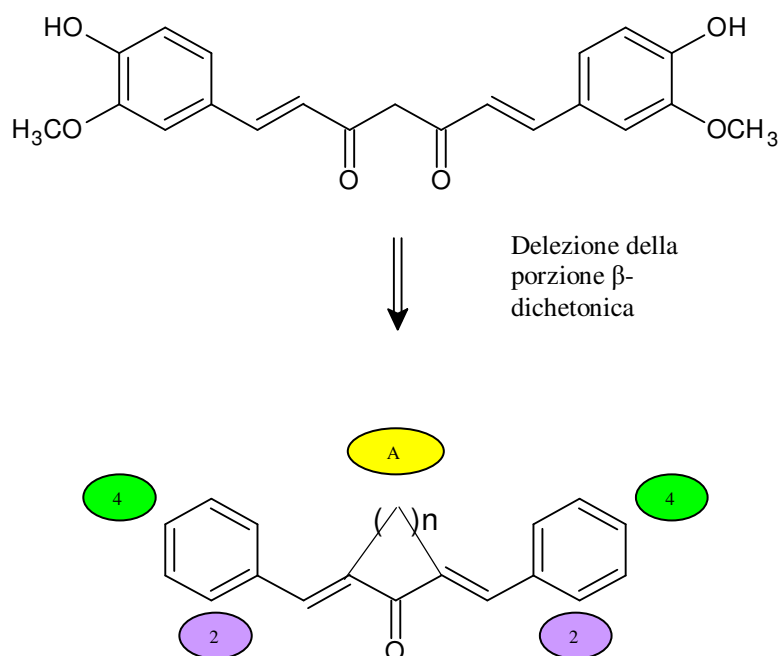


In questo caso, al contrario di quanto detto per il derivato eptadiendionico, non c'è nessuna differenza nell'attività antiproliferativa quando l'OCH₃ in 3 e l'OH in 4 si scambiano posizione.

Inoltre, eliminando o aggiungendo gruppi metossilici in posizione 3 non risulta nessuna alterazione nell'attività.

Nella curcumina proteggendo i gruppi OH in posizione 4 si ha un incremento dell'attività. Comunque, per la serie pentadienonica, convertendo i gruppi in 4 da ossidrilici a metossilici o sulfammati, l'attività non aumenta, suggerendo che i composti operano con meccanismi di azione diversi o che subiscono vie metaboliche diverse.

Altri studi, incentrati ancora sui derivati monocarbonilici della curcumina, hanno esaminato la loro attività citotossica. [40]



Le analisi SAR hanno indicato che:

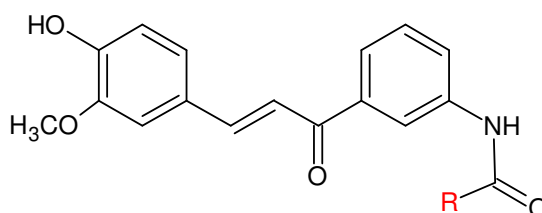
✚ sostituenti elettron-attrattori forti in posizione 2 possono aumentare la bioattività e la maggior elettronegatività di questa porzione rende il composto più citotossico. (2)

✚ sostituenti elettron-donatori deboli in posizione 4 favoriscono l'attività antitumorale del composto mentre sostituenti elettron-donatori forti possono ridurre o inibire l'attività. (4)

✚ l'acetone o il cicloesanonone come spacer migliorano notevolmente la stabilità. (A)

Da un'ulteriore ricerca sulle relazioni struttura-attività si evince che metà della struttura della curcumina, feruoil benzamido-benzene, è una promettente struttura guida per la sintesi di agenti anti-MDR. [41]

Sono stati sintetizzati molti analoghi asimmetrici **W** con diversi gruppi ammidici e ne è stata studiata l'attività anti-MDR e la modulazione della funzionalità della P-gp.



Composti **W**

E' stato evidenziato che per i composti **W** dove **R** è costituito da un gruppo elettron attrattore, questa attività aumenta, annullando l'azione inibitoria della P-gp sull'efflusso dei farmaci. In particolare l'attività risulta notevolmente incrementata con la presenza di uno o due atomi di cloro, in posizione *meta* o *para*, sul gruppo benzammidico.

INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

La resistenza ai farmaci chemioterapici rimane, ad oggi, uno dei problemi più difficili da risolvere nella terapia di molti tipi di cancro.

Questa resistenza è comunque riconosciuta come un processo multifattoriale, legato a molte interazioni molecolari comprese l'iperespressione di trasportatori, quali appunto la glicoproteina-P, ma anche l'iperattività di sistemi enzimatici implicati nello sviluppo e nella proliferazione delle cellule tumorali.

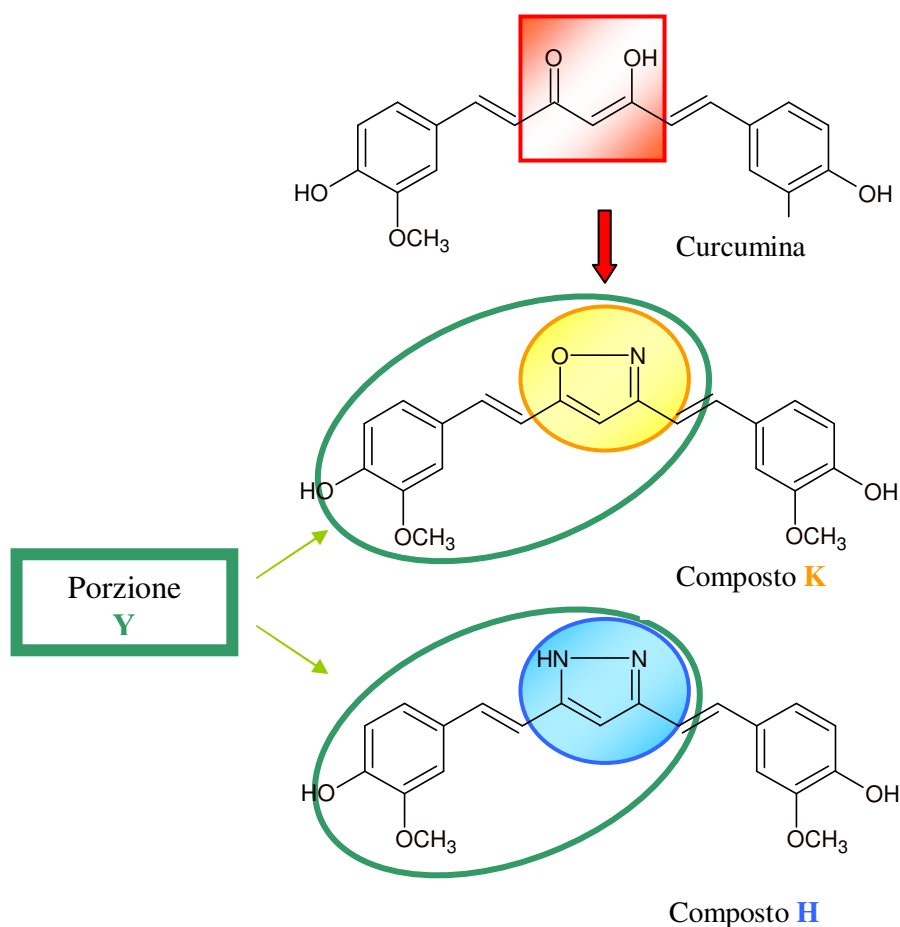
La molteplicità di fattori coinvolti nella resistenza ai farmaci (iperespressione di trasportatori, alterazione di sistemi enzimatici) evidenzia che la strategia farmaceutica migliore per superare questo limite potrebbe essere legata all'impiego di più farmaci capaci di agire su bersagli differenti (cocktail farmacologico) o all'utilizzo di un unico agente capace di agire su più target contemporaneamente (ibrido o ligando multiplo).

Da questo punto di vista è evidente come molti polifenoli presenti nella dieta siano dotati di numerosi meccanismi antitumorali e nel contempo presentino una limitata tossicità per le cellule sane. Tra questi agenti, la curcumina rappresenta un composto ad attività su molti target e quindi un potenziale farmaco da sviluppare per aumentare le sue proprietà antitumorali e chemosensibilizzanti.

Questi effetti terapeutici sono riconducibili all'elevato numero di substrati con i quali la curcumina interagisce; questa sostanza, infatti, regola numerosi fattori di trascrizione, citochine, proteine chinasi, molecole di adesione, stati ossido-riduttivi e sistemi enzimatici, i quali sono implicati in vari livelli di inizializzazione, promozione, progressione e disseminazione del tumore. Oltre ad un'attività antitumorale diretta dovuta all'interferenza con numerosi sistemi enzimatici coinvolti nella proliferazione delle cellule tumorali, l'attività chemosensibilizzante della curcumina è riconducibile alla sua capacità di modulare l'espressione e la funzionalità della glicoproteina-P.

Data l'ampia attività farmacologica della curcumina, la possibilità di esplorare questa struttura dal punto di vista chimico farmaceutico rappresenta un argomento di ricerca innovativo che consente di individuare nuovi lead compounds per lo sviluppo di farmaci utili per la prevenzione ed il trattamento di vari tipi di cancro.

Molti studi e modifiche strutturali a carico del gruppo dichetonico della molecola di curcumina hanno evidenziato che questa porzione può essere efficacemente sostituita da raggruppamenti eteroaromatici (come l'isossazolo e il pirazolo) ricchi di elettroni e che conferiscono una minore libertà conformazionale al sistema.



Infatti la valutazione farmacologica dei derivati **K** e **H** precedentemente sintetizzati, ha indicato che questi composti presentano una maggiore attività antitumorale rispetto a quella presentata dalla curcumina. Inoltre questi due analoghi della curcumina hanno mostrato un'elevata capacità di ridurre l'angiogenesi e un'aumentata attività inibitoria nei confronti della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), che è implicata in numerosi aspetti della progressione del tumore e della resistenza alla terapia.

Nel laboratorio dove è stata svolta questa tesi, erano stati sviluppati degli inibitori della P-gp, capaci di ridurre la resistenza ai farmaci su cellule tumorali in cui è iperespressa questa glicoproteina. Questi nuovi inibitori presentano come porzione farmacoforica il raggruppamento arilmetilossifenilico. [42]

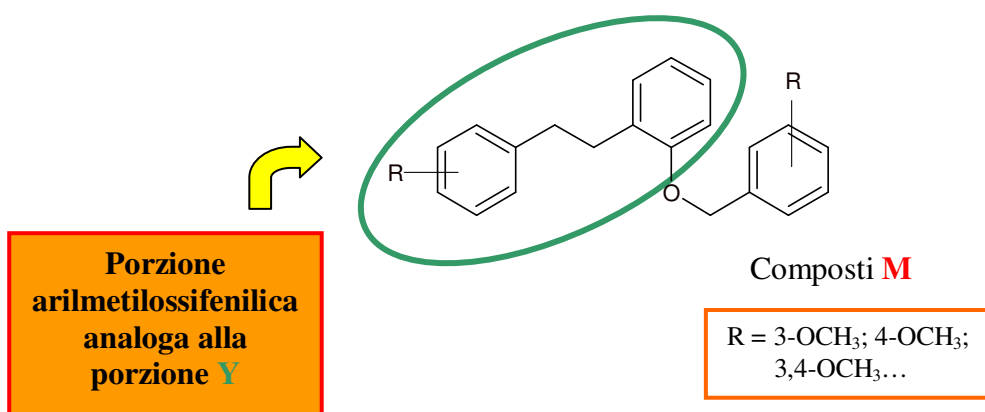
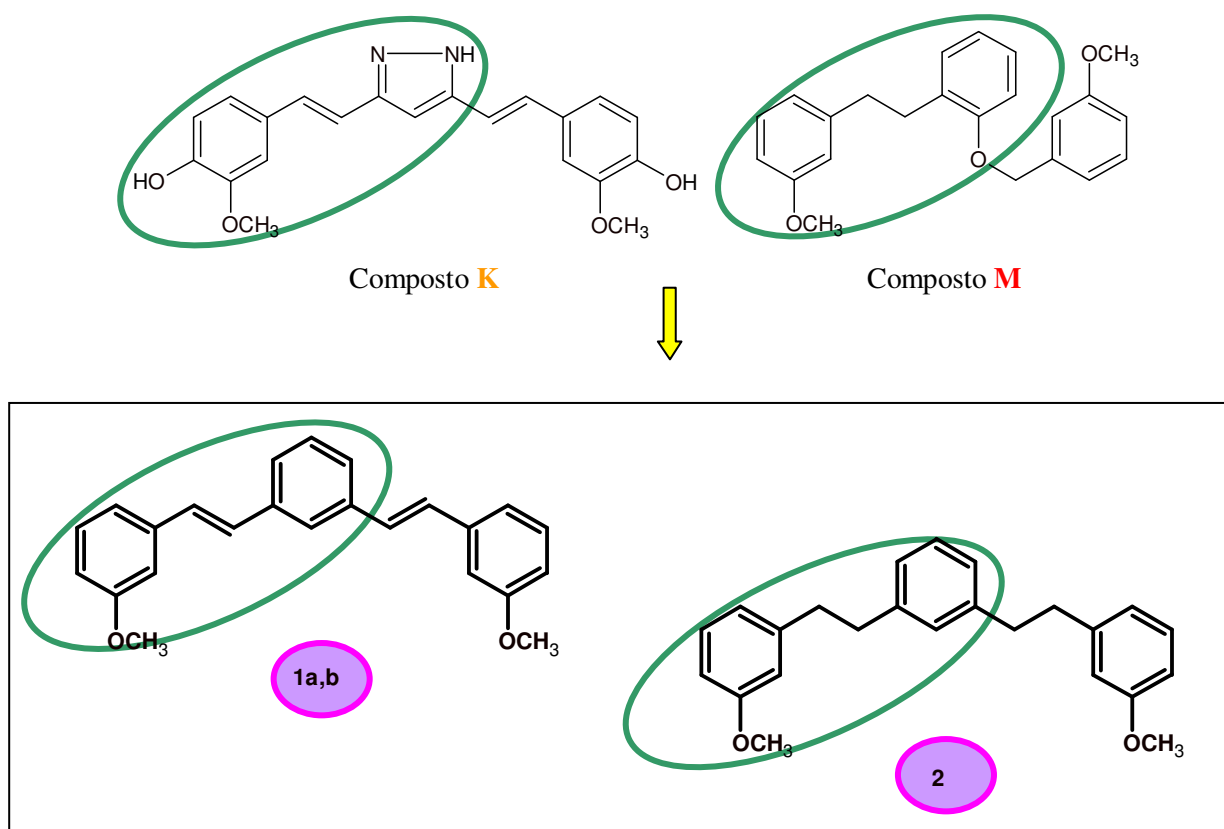


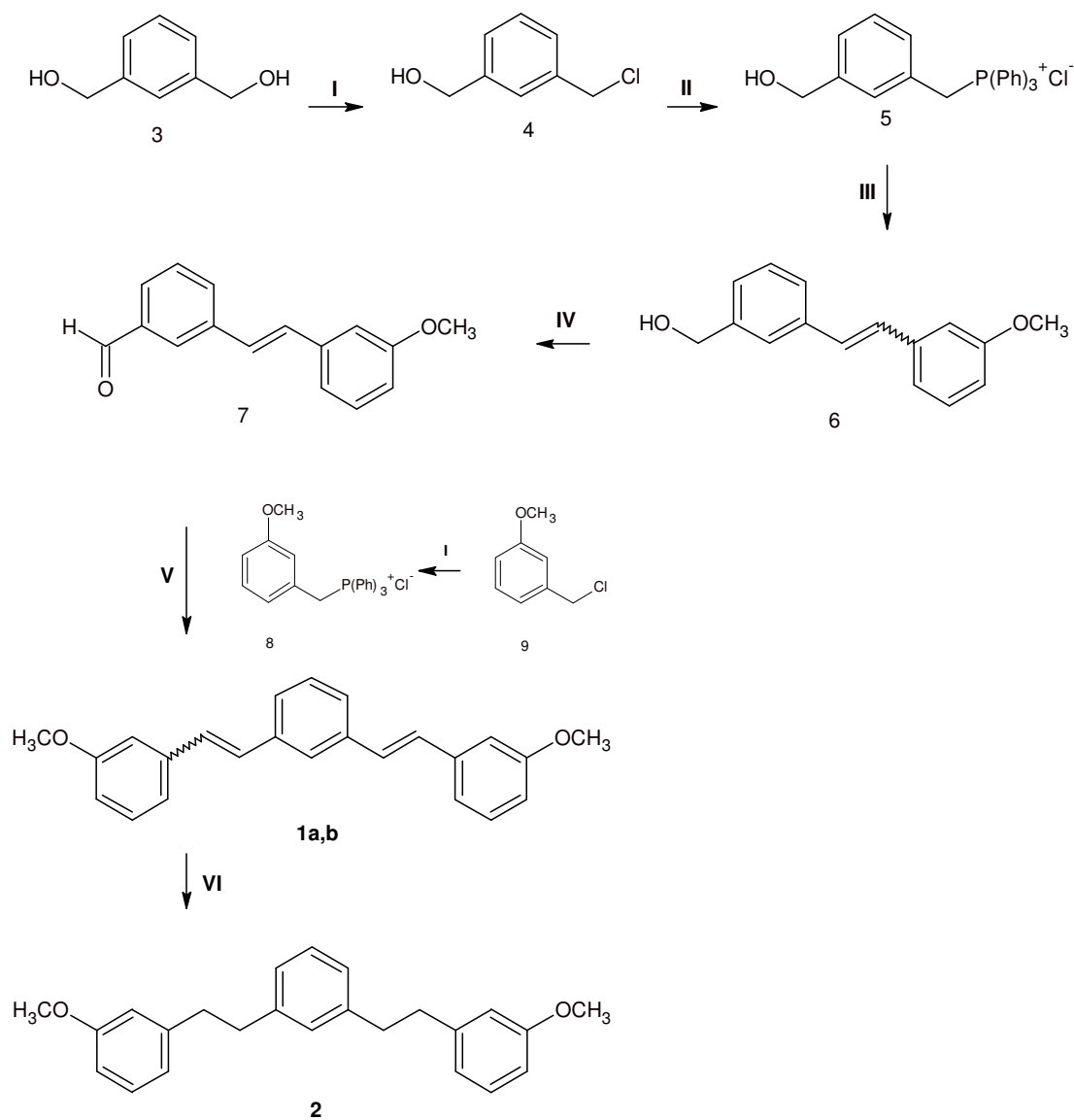
Figura 8: Struttura generale dei derivati arilmetilossifenilici ad attività P-gp inibitoria.

Questa porzione presenta una certa analogia stereoelettronica con la porzione **Y** degli analoghi della curcumina **K** e **H**.

Tenendo presente questa considerazione, in questa tesi di laurea, è stata progettata la sintesi dei composti **1a,b** e **2** che possono essere definiti ligandi multipli o ibridi in quanto presentano entrambe le porzioni farmacoforiche della curcumina e dei P-gp inibitori precedentemente sintetizzati.



SCHEMA DI SINTESI



- I** HCl conc., Toluene, t.a., 12 h
II PPh₃, CH₃CN, riflusso, 24 h
III 3-metossibenzaldeide, DBU, CH₃CN, riflusso, 24 h
IV ClCOCOCi, DMSO an., CH₂Cl₂ an., Et₃N, N₂, -60°C, 2 h
V DBU, CH₃CN, riflusso, 24 h
VI H₂, Pd/C, EtOH assoluto, t.a., 4 h

I composti **1 a,b** e **2** sono stati ottenuti seguendo la procedura descritta nello **schema di sintesi**.

Il composto **4**, ottenuto dall'1,3-benzendimetanolo **3** per reazione con HCl conc. in toluene, è stato sottoposto ad una reazione con PPh₃ in CH₃CN per ottenere il derivato **5**. La successiva reazione di Wittig del composto **5** con la 3-metossibenzaldeide ha fornito la miscela cis/trans stilbenica **6**. Il derivato stilbenico **6** di configurazione trans è stato isolato tramite precipitazione in CH₂Cl₂/Esano ed è stato sottoposto ad ossidazione di Swern fornendo il derivato aldeidico **7**. La successiva reazione di Wittig dell'aldeide **7** con il cloruro del 3-metossibenzilfosforano **8** ha condotto al derivato **1a,b** costituito dalla miscela cis/trans in rapporto 40:60.

Infine la miscela stilbenica **1a,b** è stata ridotta per idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C 10% per dare il corrispondente derivato saturo **2**.

PARTE

SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

La struttura dei composti è stata controllata per mezzo della spettrometria ^1H -NMR e di massa. Degli spettri ^1H -NMR e MS sono stati riportati i particolari più significativi. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettrali in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettro Varian Gemini 200 MHz; le soluzioni sono circa al 5% in CDCl_3 , CD_3OD . I chemical shift sono stati espressi in ppm (scala δ).

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettro Hewlett Packard 5988° per introduzione diretta di un'energia nominale di 70 eV ad una temperatura di 350°C.

I punti di fusione sono stati determinati al microscopio di Kofler e non sono stati corretti.

Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di Chimica Analitica; la differenza tra i valori teorici e quelli ottenuti è risultata essere compresa in un intervallo di $\pm 0.4\%$.

Le evaporazioni sono state eseguite in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando Na_2SO_4 .

Le TLC analitiche sono state effettuate utilizzando lastre MERCK di gel di silice (G60) con indicatore di fluorescenza 20 x 20.2 mm. Le macchie sono state evidenziate per mezzo di lampada UV (256nm).

Per le cromatografie su colonna è stato usato gel di silice 70-230 mesh.

Per la filtrazione su celite è stata usata celite[®] 521.

SINTESI DEL 3- CLOROMETIL-BENZILALCOOL 4

Ad una soluzione di 1,3-benzendimetanolo commerciale **3** (1.00 g; 7.25 mmoli) in toluene (36 ml) è stata addizionata una soluzione di HCl conc. (3.62 ml). La miscela così ottenuta è stata posta sotto agitazione, a temperatura ambiente per 12 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato. Il residuo è stato ripreso con CH₂Cl₂, lavato con H₂O e con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica è stata essiccata ed evaporata fornendo il grezzo **4** desiderato.

Resa: 88%

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.59 (s, 2H, CH₂OH); 5.11 (s, 2H, CH₂Cl); 7.29-7.38 (m, 4H, Ar) ppm.

SINTESI DEL CLORURO DEL
3-BENZILALCOOLTRIFENILFOSFORANO 5

Ad una soluzione di PPh_3 commerciale (0.92 g; 3.39 mmoli) in CH_3CN (15 ml) è stato aggiunto il composto **4** (0.50 g; 3.20 mmoli). La miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione, a riflusso per 24 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato e il grezzo è stato purificato tramite cristallizzazione da $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$ fornendo il composto desiderato **5**.

Resa: 98%

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 4.41 (s, 2H, CH_2OH); 6.89-6.94 (m, 2H, CH_2P); 7.17-7.24 (m, 1H, Ar); 7.31-7.34 (m, 2H, Ar); 7.59-7.77 (m, 12H, Ar); 7.85-7.95 (m, 4H, Ar) ppm.

SINTESI DEL COMPOSTO 6

Ad una soluzione del composto **5** (500 mg; 1.22 mmoli) in CH₃CN (20 ml) è stata aggiunta 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene (DBU) (300 mg; 1.92 mmoli) e la 3-metossibenzaldeide commerciale (166 mg; 1.22 mmoli). La miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione, a riflusso per 24 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato ripreso con CHCl₃, lavato con H₂O, HCl 1N e una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata essiccata ed evaporata fornendo un grezzo che è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente CHCl₃. La miscela dei due isomeri E/Z (in rapporto 60:40) così ottenuta è stata sottoposta a precipitazione da CH₂Cl₂/n-Esano per fornire l'isomero E (**6**).

Resa: 90%

P.f.: 64-66°C

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.86 (s, 3H, OCH₃); 4.74 (s, 2H, CH₂OH); 6.80-6.86 (m, 1H, Ar); 7.06-7.13 (m, 3H, Ar); 7.09 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, CH=); 7.24-7.36 (m, 3H, Ar, CH=); 7.40-7.47 (m, 1H, Ar); 7.54 (s, 1H, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

C ₁₆ H ₁₆ O ₂	C	H
Calc. %	79.97	6.71
Trov. %	80.27	7.01

SINTESI DEL DERIVATO ALDEIDICO 7

Ad una soluzione di DMSO anidro (0.74 ml) e CH₂Cl₂ anidro (5 ml) raffreddata a -60°C e posta sotto N₂ è stato aggiunto il cloruro di ossalile (0.69 g; 5.41 mmoli). La soluzione risultante è stata addizionata del composto **6** (0.10 g; 0.42 mmoli) sciolto nella minima quantità di CH₂Cl₂ anidro e precedentemente raffreddato a -60°C. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a tale temperatura per 2 h, quindi è stata aggiunta Et₃N (2.20 g; 21.73 mmoli) e la soluzione è stata ripresa con CH₂Cl₂ e lavata con H₂O. La fase organica è stata essiccata ed evaporata fornendo il composto **7** desiderato.

Resa: 97%

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.86 (s, 3H, OCH₃); 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.5, 8.1 Hz, Ar); 7.07-7.17 (m, 2H, Ar); 7.12 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, CH=); 7.30 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, CH=); 7.26-7.34 (m, 1H, Ar); 7.49-7.57 (m, 1H, Ar); 7.74-7.79 (m, 2H, Ar); 8.03 (s, 1H, Ar); 10.05 (s, 1H, CHO) ppm.

SINTESI DEL CLORURO DEL
3-METOSSIBENZILTRIFENILFOSFORANO 8

Ad una soluzione di 3-metossibenzilcloruro commerciale **9** (5.00 g; 32.00 mmoli) in CH₃CN (20 ml) è stata addizionata PPh₃ (9.20 g; 33.93 mmoli). La miscela così ottenuta è stata posta sotto agitazione, a riflusso per 12 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato e il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cristallizzazione da CHCl₃/Et₂O fornendo il composto desiderato **8**.

Resa: 98%

MS (*m/z*): 383 (M⁺ -Cl, 28%)

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.53 (s, 3H, OCH₃); 5.44 (d, 2H, *J* = 16 Hz, CH₂); 6.60-6.77 (m, 3H, Ar); 7.02 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.11-7.21 (m, 15H, Ph) ppm.

SINTESI DEL COMPOSTO FINALE 1a,b

Ad una soluzione del composto **8** (172 mg; 0.41 mmoli) in CH₃CN (10 ml) è stata aggiunta 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene (DBU) (10 mg; 0.38 mmoli) e successivamente il composto **7** (98 mg; 0.42 mmoli). La miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione, a riflusso per 24 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato ripreso con CHCl₃, lavato con H₂O, HCl 1N e con una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata essiccata ed evaporata fornendo un grezzo che è stato sottoposto a cromatografia su colonna, utilizzando come miscela eluente CHCl₃/n-Esano in rapporto 4:6. Il derivato così ottenuto, costituito da una miscela di isomeri E/E e E/Z (**1a,b**) in rapporto 60:40 è stata sottoposta a cristallizzazione da EtOH fornendo un solido costituito essenzialmente dall'isomero E/E (in rapporto 93:7).

Resa: 92%

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.86 (s, 6H, OCH₃); 6.81-6.86 (m, 2H, Ar); 7.07-7.16 (m, 8H, Ar, CH=); 7.29-7.45 (m, 5H, Ar, CH=); 7.65 (s, 1H, Ar) ppm

¹³C NMR (CDCl₃): δ 160.32, 139.12, 138.05, 129.98, 129.34, 129.22, 126.18, 125.17, 119.66, 113.83, 112.23, 55.67 ppm

ANALISI ELEMENTARE:

C₂₄H₂₂O₂	C	H
Calc. %	84.18	6.48
Trov. %	84.38	6.28

SINTESI DEL COMPOSTO FINALE 2

La miscela stilbenica **1a,b** (24 mg; 0.07 mmoli) è stata sottoposta ad idrogenazione in EtOH assoluto (25 ml), utilizzando come catalizzatore Pd/C 10% (100 mg; 0.94 mmoli), per 12 h a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo, il catalizzatore è stato filtrato su celite ed il filtrato è stato evaporato per fornire il grezzo **2** saturo.

Resa: 70%

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.87 (s, 8H, CH₂); 3.78 (s, 6H, OCH₃); 6.73-6.80 (m, 5H, Ar); 6.99-7.05 (m, 3H, Ar); 7.17-7.34 (m, 3H, Ar); 7.82 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar) ppm.

¹³C NMR (CDCl₃): δ 130.05, 129.58, 126.85, 126.36, 121.22, 114.65, 111.66, 55.53, 38.41, 38.18 ppm

ANALISI ELEMENTARE:

C₂₄H₂₆O₂	C	H
Calc. %	83.20	7.56
Trov. %	82.80	7.16

BIBLIOGRAFIA

- [1] Ajay Goel, Ajaikumar B., Kunnumakkara, Bharat B., Aggarwal. Curcumina as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 75, 2008, 787-809.
- [2] Bharat B. Aggarwal, Kuzhuvelil B. Harikumar. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 2009, 40-51.
- [3] Annelyse Duvoix, Romain Blasius, Sylvie Delhalle, Michael Schneckenburg, Franck Morceau, Estelle Henry, Mario Dicato, Marc Diederich. *Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin*. Cancer Letters 223, 2005, 181-190.
- [4] Barnes, P., Karin, M. Nuclear factor-kappa B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1997, 1066-1071.
- [5] Jobin, Bradham, Russo, Juma, Narula, Brenner, Sartor. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 163, 1999, 3474-3483.
- [6] Singh, S., Aggarwal, B.B. Activation of transcription factor Nf-kB is suppressed by curcumin (diferuolmethane). *J. Biol. Chem.* 270, 1995, 24995-25000.
- [7] Huang T., Lee S.C., Lin J.K. Suppression of c-jun/AP1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, 5292-5296.
- [8] Lin J., Shih C.A. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis* 15, 1994, 1717-1721.

- [9] Joe B. and Lokesh B.R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1224, 1994, 255-263.
- [10] Jefremov V., Zilmer M., Zilmer K., Bogdanovic N., Karelson E. Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection of G protein signalling to prevention of age-related pathologies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1095, 2007, 449-457.
- [11] Joseph J.A. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behaviour: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am. J. Clin.* 2005, 81 (Suppl.): 313S-316S.
- [12] Cowburn R.F. Receptor-G-protein signalling in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Symp.* 2001, 67: 163-175.
- [13] Zhang A. A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper catalyzed oxidation. *Clin. Chim. Acta* 1994, 227: 159-173.
- [14] Kelly M.J. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, 12: 152-156.
- [15] Nishida M. Activation mechanism of G_i and G_0 by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 9036-9042.
- [16] Moller D.E., Berger J.P. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003, 27 (Suppl.3): S17-21.
- [17] Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F.M., Torti S.V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65, 2008, 1631-1652.

- [18] Sindhwani P., Hampton J.A., Baig M.M., Keck R., Selman S.H. Curcumin prevents intravesical tumor implantation of the MBT-2 tumor cell line C3H mice. *J.Urol.* 2001, 166, 1498-1501.
- [19] Hour T., Chen J., Huang C.Y., Guan J.Y., Lu S.H., Pu Y.S. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21 (WAF1/CIP1) and C/EBP beta expressions and suppressing NF-kB activation. *Prostate* 2002, 51, 211-218.
- [20] Chuang S.E., Yeh P.Y., Lu Y.S., Lai G.M., Liao C.M., Gao M., Cheng A.L. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappa B (NF-kB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone and curcumin in carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 63, 1709-1716.
- [21] Verma S.P., Goldin B.R., Lin P.S. The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ. Health Perspect* 1998, 166, 807-812.
- [22] Bharti A., Donato N., Singh S., Aggarwal B.B. Curcumin (diferuolmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kB and Ikb α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003, 101, 1053-1062.
- [23] Bava S.V., Puliappadamba V.T., Deepti A., Nair A., Karunagaran D., Anto R.J. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of NF-kB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* 2005, 6301-6308.
- [24] Jagetia G. C. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007, 595, 301-320.
- [25] Chendil D., Ranga R.S., Meigooni D., Sathishkumar S., Ahmed M.M. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 2004, 23, 1599-1607.

- [26] Gururaj A., Belakavadi M., Venkatesh D.A., Marme D., Salimath B.P. Molecular mechanisms of antiangiogenic effect of curcumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 297, 934-942.
- [27] Xu Y., Ku B.S., Yao H.Y., Lin Y.H., Zhang Y.H. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 518: 40-46.
- [28] Sharma R.A., Steward W.P., Gescher A.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007, 585: 453-470.
- [29] Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 2007, 4: 807-818.
- [30] Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetic of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998, 64: 353-356.
- [31] Lopez-Lazaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol. Nutr. Food Res* 2008.
- [32] Somasundaram S., Edmund N.A, Moore D.T., Small G.W., Shi Y.Y., Orlowsky R.Z. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res* 2002, 62: 3868-3875.
- [33] W. Chearwae, S. Anuchapreeda, K. Nandigama, S.V. Ambudkar, P. Limtrakul. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABC B1) by curcumin I, II and III purified from Turmeric powered. *Biochemical Pharmacology* 2004, 68, 2043-2052.
- [34] Gottesman M.M., Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62, 358-427.

- [35] Pérez-Tomás R. Multidrug Resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 2006, 13, 1859-1876.
- [36] Xiao-Long Hau, Kyoko Takahashi, Ken Tanaka, Katsuhiko Tougou, Feng Qiu, Katsuko Komatsu, Koichi Takahashi, Junichi Azuma. Curcuma drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways. *Intern. J. of Pharmaceutics* 2008, 358, 224-229.
- [37] Limtrakul P., Anuchapreeda S., Budahasukh D. Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 2004, 4, 13.
- [38] Tang X. Q., Bu H., Feng J.Q., Cao J.G. Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005, 1009-1016.
- [39] J.R. Fuchs, B. Pandit, D.Bhasin, J.P. Etter, N. Regan, D. Abdelhamid, C. Li, J. Lin, P. Li. Structure-activity relationship studies of curcumin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 2009, 2065-2069.
- [40] G. Liang, L. Shao, Y. Wang, C. Zhao, Y. Chu, J. Xiao, Y. Zhao, X. Li, S. Yang. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2009, 2623-2631
- [41] Y. Um, S.Cho, H.B. Woo, Y.K. Kim, H. Kim, J. Ham, S. Kim, C.M. Ahn, S. Lee. Synthesis of curcumin mimics with multidrug resistance reversal activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 2008, 3608-3615.
- [42] Nicola Antonio Colabufo, Francesco Berardi, Roberto Perrone, Simona Rapposelli, Maria Digiacoimo, Michael Vanni, Aldo Balsamo. Synthesis and biological evaluation of (Hetero)arylmethoxy- and arylmethylaniline-phenyl derivatives as potent P-glycoprotein modulating agents. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 1415-1422.

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE.....	1
 CURCUMINA.....	 2
 CLASSIFICAZIONE BOTANICA.....	 5
 ASPETTI FARMACOLOGICI DELLA CURCUMINA.....	 6
Gli effetti terapeutici tradizionali.....	6
Attività antinfiammatoria.....	6
Attività antiossidante.....	8
Attività antiaggregante.....	9
Attività ipoglicemizzante.....	9
Attività antitumorale.....	10
Gli ultimi impieghi clinici.....	13
 CENNI DI FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA.....	 14
Distribuzione e metabolismo.....	14
La biodisponibilità.....	16
I potenziali effetti indesiderati e la tossicità.....	16
 MODULAZIONE DELLA P-gp DA PARTE DELLA CURCUMINA	18
 RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITA' DEGLI ANALOGHI DELLA CURCUMINA.....	 21
 INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE.....	 26
 PARTE SPERIMENTALE.....	 32
 BIBLIOGRAFIA.....	 41
 INDICE.....	 46

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio:

Il prof. Aldo Balsamo per avermi permesso di svolgere la tesi in questo laboratorio.

La dott.ssa Simona Rapposelli per la sua professionalità e disponibilità che mi ha sempre dimostrato.

La dott.ssa Giulia Nesi e la dott.ssa Maria Digiaco per avermi insegnato e consigliato, per la loro inesauribile pazienza e per il clima di serenità che ogni mattina regnava in laboratorio.

Tutti i dottorandi e i laureandi che durante tutti questi mesi hanno contribuito a rendere indimenticabile quest'ultimo periodo.

Un grazie speciale lo devo ai miei genitori che hanno permesso che il mio sogno diventasse realtà. Grazie per essermi sempre stati vicini, per avermi consolato nei momenti difficili e per aver sempre creduto in me.

A tutti i miei amici che con il loro affetto hanno alleviato le mie ansie e le mie preoccupazioni prima di ogni esame. Il vostro aiuto è stato importante per poter affrontare questo periodo della mia vita.